

El sistema vomeronasal y su posible funcionalidad en larvas de anuros

Lucas David Jungblut, Andrea Gabriela Pozzi, Dante Agustín Paz

Laboratorio de Biología del Desarrollo, Instituto de Fisiología Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET) y Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Recibido: 13 Agosto 2012

Revisado: 17 Setiembre 2012

Aceptado: 12 Diciembre 2012

Editor Asociado: M. F. Vera Candioti

RESUMEN

El sistema vomeronasal (SVN) es un sistema olfatorio accesorio presente en la mayoría de los tetrápodos. Clásicamente se lo ha asociado con el paso de los vertebrados al ambiente terrestre; sin embargo las evidencias surgidas en los últimos años indican que el SVN apareció tempranamente en la evolución de los tetrápodos y sería funcional en ambientes acuáticos. Este sistema sensorial ha sido descrito en etapas larvales de anuros. Pero ¿es funcional el SVN en renacuajos? No existen experimentos en donde se evalúe la participación del SVN en la quimiodetección en renacuajos. Sin embargo, un número considerable de evidencias indican que este sistema sensorial podría ser funcional en larvas de anuros: 1) El órgano vomeronasal (OVN) aparece durante el desarrollo embrionario y está presente durante toda la etapa larval. 2) El OVN contiene neuronas bipolares cuyos axones proyectan al bulbo olfatorio accesorio (BOA) donde establecen conexiones sinápticas con neuronas telencefálicas. 3) Las neuronas del OVN expresan los receptores de membrana descritos en tetrápodos, así como la proteína G involucrada en la señalización intracelular. 4) Los análisis de microscopía electrónica demuestran que el OVN posee neuronas con microvellosidades apicales como se describe para otros grupos y sus características ultraestructurales no se modifican durante la metamorfosis. Más aún, no hay diferencias en la ultraestructura de las conexiones sinápticas entre larvas y adultos a nivel del BOA. Los renacuajos presentan una gran cantidad de comportamientos mediados por quimiodetección. Conocer si el SVN participa en la detección de alguno/s de estos estímulos ayudaría no sólo a dilucidar aspectos relacionados con la comunicación química y el comportamiento en renacuajos sino también a comprender aspectos evolutivos de los sistemas quimiosensoriales en vertebrados.

Palabras clave: Quimiodetección; Órgano vomeronasal; Renacuajo; Feromona.

ABSTRACT

The vomeronasal system (VNS) is an accessory olfactory system present in most tetrapods. Classically, the VNS has been associated with terrestriality in vertebrates; however, evidence emerged in recent years suggest that this sensory system appears earlier in tetrapods evolution and may play a role in chemosensory detection in aquatic environments. This sensory system has been described in anuran larvae. But, is the VNS functional in tadpoles? There are no experiments that evaluate the involvement of the VNS in chemodetection in tadpoles. However, a growing body of evidence suggests that the VNS could be a functional sensory system in anuran larvae: 1) The vomeronasal organ (VNO) appears during embryonic development and it is present throughout the larval phase. 2) The VNO contains bipolar neurons whose axons project to the accessory olfactory bulb (AOB) where they establish synaptic contact with telencephalic neurons. 3) The vomeronasal neurons express specific membrane receptors described in the VNO of tetrapods, and the G protein involved in intracellular signaling. 4) Electron microscopy analysis demonstrates that the vomeronasal neurons have apical microvilli as described in other groups and their ultrastructural features do not change during metamorphosis. Moreover, there are no differences in the ultrastructure of the synaptic connections in the AOB between tadpoles and adults. Tadpoles exhibit a large number of chemodetection mediated behaviors.

Knowing whether the VNS is functional in tadpoles will contribute to elucidating aspects of chemical communication and tadpole behavior, and would allow us to better understand evolutionary aspects of chemosensory systems in vertebrates.

Key words: Chemodetection; Vomeronasal organ; Tadpole; Pheromone.

Introducción

El sistema vomeronasal (SVN) es un sistema olfatorio accesorio formado por un conjunto de estructuras anatómica e histológicamente distinguibles del sistema olfatorio principal y que está presente en la mayoría de los reptiles, mamíferos y anfibios. A modo general, el SVN está formado por un órgano discreto par (el órgano vomeronasal, o de Jacobson) ubicado en la mayoría de los casos en la base de ambas cavidades nasales. El órgano vomeronasal (OVN) contiene a las neuronas receptoras vomeronasales (NRV) que presentan una típica morfología bipolar. En la porción apical las NRV proyectan su proceso dendrítico hacia el lumen del OVN donde entran en contacto directo con el medio externo; de la parte proximal de los cuerpos neuronales se extienden los correspondientes axones que se unen en el conectivo subyacente formando un nervio vomeronasal. Estos axones proyectan hacia la porción anterior del telencéfalo y hacen sinapsis en el bulbo olfatorio accesorio (BOA), el cual constituye el segundo componente distintivo del SVN (Halpern y Martinez-Marcos, 2003).

En peces, las estructuras anatómicas características de este sistema sensorial (OVN y BOA) no han sido identificadas. Además, el SVN está ausente en varios grupos de tetrápodos como cocodrilos, aves, la mayoría de los murciélagos, mamíferos marinos y monos del viejo mundo (Bertmar, 1981; Eisthen, 1992; Bhatnagar y Meisami, 1998; Halpern y Martinez-Marcos, 2003). Como el SVN no está presente en peces y se ha perdido en algunos tetrápodos secundariamente acuáticos o de hábitos arborícolas, Bertmar (1981) consideró que este sistema sensorial apareció durante la evolución de los tetrápodos como una consecuencia de la adaptación al ambiente terrestre. Sin embargo, las evidencias surgidas en los últimos años desafían esta hipótesis y sugieren que este sistema sensorial ya estaba presente en el ancestro común acuático de los tetrápodos (Eisthen, 1997; Grus y Zhang, 2006).

En este sentido, un SVN presuntivo ha sido identificado recientemente en el pez pulmonado *Protopterus dolloi* (Gonzalez *et al.*, 2011). En esta

especie se han encontrado criptas epiteliales en la base de las lamelas del epitelio olfatorio cuyas neuronas sensoriales expresan marcadores moleculares descritos en las NRV de tetrápodos. Claramente esta organización anatómica de criptas epiteliales difiere marcadamente de un OVN discreto como se observa generalmente en tetrápodos. Sin embargo, a través del marcado de trazos neuronales se observó que las neuronas de todas estas criptas proyectan sus axones al margen lateral del bulbo olfatorio (BOA presuntivo) y desde allí hacia áreas cerebrales homólogas a las que intervienen en el procesamiento de la información del SVN en tetrápodos (Moreno y Gonzalez, 2007). Además, al menos algunos genes específicos del SVN, han sido identificados en peces óseos, elasmobranquios y lampreas (Grus y Zhang, 2009), sugiriendo que este sistema sensorial apareció tempranamente en la filogenia de los vertebrados y que cumpliría una función en la quimiodetección en ambientes acuáticos.

Por otra parte, el SVN está presente en los tres órdenes de anfibios actuales: anuros, urodelos y ápodos (Reiss y Eisthen, 2008). Una característica interesante es que este sistema sensorial está presente incluso en anfibios completamente acuáticos. En urodelos, se ha identificado un SVN desarrollado en representantes de las familias Amphiumidae y Sirenidae que son permanentemente acuáticos (Eisthen, 2000), aunque el SVN se ha perdido aparentemente en miembros de la familia Proteidae que también pasan su vida en el agua (Farbman y Gesteland, 1974; Seydel, 1895; Eisthen, 2000). En ápodos, un estudio interesante donde se compara la región nasal en representantes de seis familias mostró que el OVN se encuentra más desarrollado (presenta un mayor tamaño) en las especies acuáticas (Schmidt y Wake, 1990). En anuros, el SVN también está presente en las especies acuáticas de la familia Pipidae (Paterson, 1951). Incluso, se ha especulado que el OVN participaría en la detección de estímulos en el agua en ranas de hábitos semi-acuáticos del género *Pelophylax* (Døving *et al.*, 1993). Además, el SVN está presente durante la etapa larval de anuros y no

se desarrolla durante el clímax metamórfico como podría esperarse si este sistema sensorial hubiera aparecido como una consecuencia de la adaptación al ambiente terrestre (Rowedder, 1937; Cooper, 1943; Tsui, 1946; Tsui y Pan, 1946; Yvrou, 1966; Khalil, 1978; Nieuwkoop y Faber, 1994; Taniguchi *et al.*, 1996; Jermakowicz *et al.*, 2004; Benzekri y Reiss, 2011; Jungblut *et al.*, 2011; Jungblut *et al.*, 2012).

Respecto a la funcionalidad de este sistema sensorial, generalmente se asocia al SVN con la detección de feromonas, es decir, con la detección de estímulos involucrados en la comunicación intra-específica (Belluscio *et al.*, 1999; Buck, 2000; Dulac, 2000). Claramente el SVN participa en la detección de feromonas sexuales en mamíferos (Keverne, 2004), reptiles (Shine, 2003) y anfibios urodelos (Toyoda y Kikuyama, 2000; Wirsig-Wiechmann *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que algunas feromonas son detectadas por el sistema olfatorio principal en mamíferos y no por el SVN (Schaal *et al.*, 2003). Además, analizando los resultados obtenidos en los diferentes grupos de tetrápodos, resulta evidente que el SVN participa, en realidad, en la detección de una variedad de estímulos no siempre vinculados a fenómenos de comunicación intraespecífica (Halpern y Martinez-Marcos 2003; Baxi *et al.*, 2006; Eisthen y Polese, 2007; Shepherd, 2006). Por ejemplo, se ha demostrado que el SVN es fundamental para la detección de estímulos relacionados con la localización de presas en reptiles (Graves y Halpern, 1990; Alving y Kardong, 1996) y anfibios urodelos (Placyk y Graves, 2002); en mamíferos el SVN tiene incidencia sobre la preferencia por el alimento (Halpern *et al.*, 2005) y modula respuestas defensivas disparadas por la detección de señales interespecíficas (Papes *et al.*, 2010). Es decir que no está del todo claro en la actualidad cuál o cuáles son las características distintivas de los estímulos que son detectados en uno u otro sistema sensorial. Una hipótesis sugiere que el SVN participa en la detección de moléculas de alto peso molecular (poco o no volátiles), mientras que el sistema olfatorio principal mediaría la detección de moléculas volátiles de bajo peso molecular (Baxi *et al.*, 2006). Otra hipótesis que ha recibido mucho menos atención que la anterior pero que resulta muy interesante sugiere que el SVN participa en la detección de estímulos novedosos para el animal, los cuales a través de la experiencia se irían asociando al sistema olfatorio principal (Meredith, 1986). Sin embargo, ninguna de estas hipótesis puede ser aún

aceptada o rechazada debido a la escasa cantidad de datos disponibles en la actualidad, sobre todo datos provenientes de los diferentes grupos de vertebrados que permitan realizar análisis comparados.

Como se mencionó anteriormente, el SVN, o al menos su componente periférico, el OVN, está presente en los renacuajos de todas las especies que se han estudiado hasta el momento (Tabla 1). Pero, ¿es funcional este sistema sensorial en las etapas larvales de anuros? Dos mecanismos son esenciales para la formación de sistemas quimiosensoriales funcionales: 1) la morfogénesis del epitelio sensorial, nervio y bulbo olfatorio (OVN-nervio-BOA, en este caso), que involucra la correcta organización de las conexiones epitelio-bulbares, y 2) la diferenciación de las neuronas sensoriales (Farbman, 1992). En el presente trabajo realizamos una revisión y discusión de los datos acumulados hasta la actualidad por diferentes autores en diferentes especies, que sugieren que el SVN podría ser un sistema sensorial funcional en renacuajos, participando de la detección de estímulos específicos.

Organización anatómica general del SVN en renacuajos

El OVN en larvas de anuros consiste en una estructura de forma arriñonada localizada rostromedialmente en la región nasal. En la figura 1A se muestra un esquema que resume la organización general de los sistemas quimiosensoriales en renacuajos. El OVN se localiza en un divertículo de la cavidad nasal en posición rostroventral al epitelio olfatorio. En una dirección rostrocaudal, el OVN es la primera estructura sensorial que aparece en cortes transversales, localizado dorsolateralmente a los cuernos trabeculares (Fig 1B). Esta posición del OVN se observa en los renacuajos de todas las especies estudiadas (Hinsberg, 1901; Rowedder, 1937; Cooper, 1943; Tsui, 1946; Tsui y Pan, 1946; Yvrou, 1966; Khalil, 1978; Nieuwkoop y Faber, 1994; Taniguchi *et al.*, 1996; Jermakowicz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Jungblut *et al.*, 2011; Jungblut *et al.*, 2012), excepto en las larvas de la especie *Ascaphus truei* cuyo OVN se localiza en un divertículo ventrolateral a la cavidad olfatoria (Benzekri y Reiss, 2011). Esta característica observada en las larvas de *A. truei* resulta interesante ya que la posición ventrolateral del OVN en la cavidad olfatoria se observa generalmente en urodelos (Stuelpnagel y Reiss, 2005). La organización histológica del OVN en renacuajos es muy similar a la descrita en otros grupos de tetrápodos y consiste

Tabla 1. Especies de anuros en que se ha encontrado el OVN durante la etapa larval. *Los nombres de las especies fueron actualizados utilizando una base de datos online (Frost, 2011). Entre paréntesis se muestran los nombres de las especies según figuran en las respectivas publicaciones originales. **En los casos en que los trabajos analizan la serie ontogenética completa (SOC, que abarca desde etapas embrionarias hasta completar la metamorfosis) se especifica entre paréntesis el estadio de desarrollo aproximado en que el OVN aparece.

Especie*	Estadio del desarrollo analizado**	Referencias
<i>Rana temporaria</i> (<i>Rana fusca</i>)	SOC (~G21-25)	Hinsberg, 1901
<i>Alytes obstetricans</i>	SOC (~G21-25)	Rowedder, 1937
<i>Bufo bufo</i> (<i>Bufo vulgaris</i>)	SOC (~G22-25)	
<i>Lithobates pipiens</i> (<i>Rana pipiens</i>)	SOC (~G21-23)	Cooper, 1943
<i>Pelophylax nigromaculatus</i> (<i>Rana nigromaculata</i>)	SOC (~G21-23)	Tsui, 1946
<i>Kaloula borealis</i>	SOC (~G21-25)	Tsui y Pan, 1946
<i>Amietophrynus regularis</i> (<i>Bufo regularis</i>)	SOC (~G31)	Khalil, 1978
<i>Xenopus laevis</i>	SOC (N/F37-38)	Nieuwkoop y Faber, 1994
<i>Rana japonica</i>	SOC (~G21-23)	Taniguchi <i>et al.</i> , 1996
<i>Anaxyrus americanus</i> (<i>Bufo americanus</i>)	SOC (G34)	Jermakowicz III <i>et al.</i> , 2004
<i>Rana chensinensis</i>	SOC (G21-23)	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhinella arenarum</i>	SOC (G24-25)	Jungblut <i>et al.</i> , 2011
<i>Ascapus truei</i>	G26-30	Benzekri y Reiss, 2011
<i>Scinax acuminatus</i>	G37	Jungblut <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypsiboas curupi</i>	G29-30	
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	SOC (G24-25)	
<i>Phyllomedusa azurea</i>	G36-37	
<i>Limnomedusa macroglossa</i>	G38	
<i>Dermatonotus muelleri</i>	G28-30	
<i>Crossodactylus schmidtii</i>	G36-38	
<i>Physalaemus sp.</i>	G39	
<i>Lepidobatrachus llanensis</i>	G36-37	
<i>Leptodactylus latrans</i>	G37-38	
<i>Lithobates catesbeianus</i>	G33-36	
<i>Discoglossus pictus</i>	SOC (N/F50)	Královec <i>et al.</i> , 2012

en un epitelio sensorial pseudoestratificado con tres tipos celulares básicos: las células progenitoras basales, las neuronas sensoriales (NRV) y las células de sostén. Los axones de las NRV proyectan al BOA localizado ventrolateralmente en la porción anterior del telencéfalo, levemente caudal al bulbo olfatorio principal (Fig. 1A). El BOA consiste en un núcleo ovoide alargado rostrocaudalmente, que puede ser identificado en cortes histológicos sin la necesidad de utilizar marcadores específicos ya que forma una estructura separada del bulbo olfatorio principal (Fig. 1C).

No existen experimentos en renacuajos donde se evalúe la participación del SVN en la detección de estímulos químicos en el ambiente. Sin embargo, si bien su funcionalidad no ha sido demostrada de manera directa, una considerable cantidad de evidencia

indica que un grado importante de maduración se alcanza en este sistema sensorial durante la etapa larval en anuros. Esta maduración tiene que ver con diferentes parámetros (morfológicos, histológicos, ultraestructurales, bioquímicos y moleculares) que indican la presencia de neuronas diferenciadas tanto en el OVN como en el BOA. Incluso, como desarrollaremos mas adelante, algunos de estos parámetros resultan indistinguibles entre larvas y adultos.

El primer dato a tener en cuenta es el momento del desarrollo en que el SVN aparece en anuros. En la gran mayoría de las especies en que se ha estudiado la región nasal durante la ontogenia se encontró que el OVN se forma tempranamente como una evaginación ventral del placode olfatorio, temporalmente asociado a la etapa en que se desarrolla el opérculo (etapa embrionaria tardía). En *Xenopus laevis* el

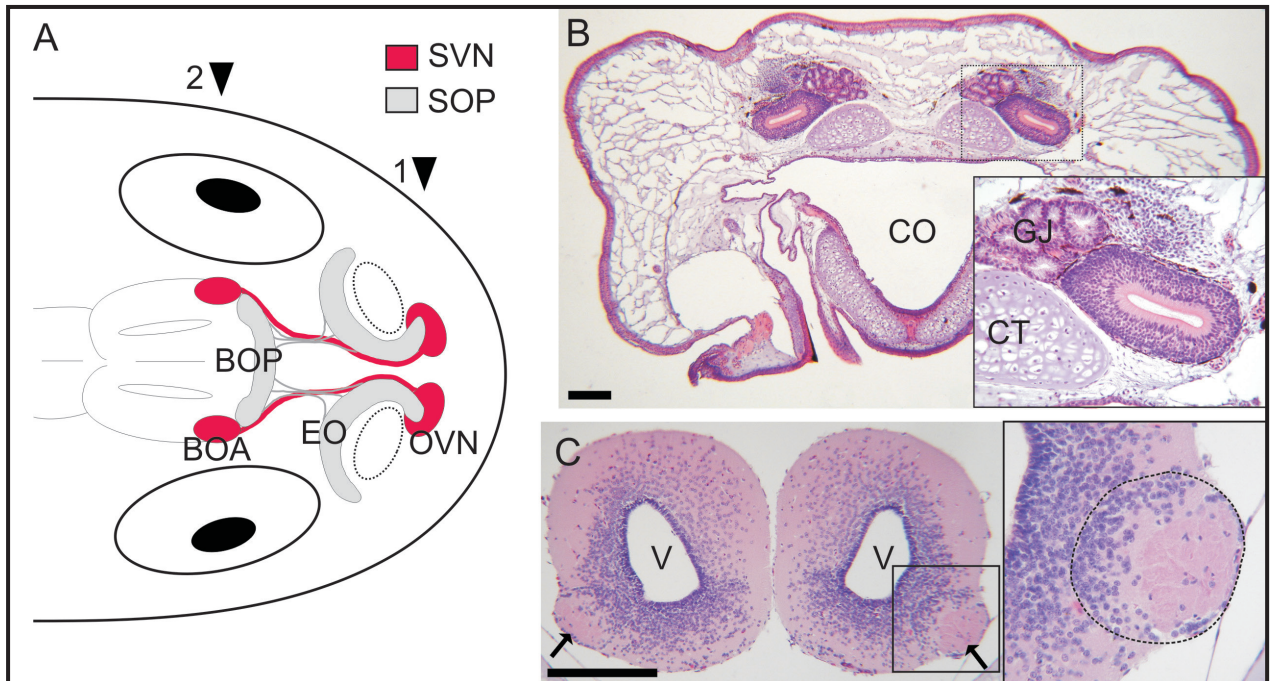


Figura 1. A. Esquema de la organización anatómica general del sistema olfatorio accesorio o vomeronasal (SVN, rojo) y el sistema olfatorio principal (SOP, gris) en renacuajos. EO: epitelio olfatorio, BOA: bulbo olfatorio accesorio, BOP: bulbo olfatorio principal, OVN: órgano vomeronasal. Los círculos de línea punteada marcan la posición de las narinas externas. B y C. Cortes transversales de larvas de *Hypsiboas pulchellus* (G32) realizados a las alturas 1 y 2 (cabezas de flecha en A), respectivamente (coloración: Hematoxilina-Eosina). B. Se observan los OVN en la región nasal anterior, ubicados dorsolateralmente a los cuernos trabeculares (CT), así como los túbulos ramificados de las glándulas de Jacobson (GJ) en la región medial al OVN. El inserto muestra una magnificación del área recuadrada. CO: cavidad oral. C. El BOA se identifica claramente a cada lado del telencéfalo en posición ventral (flechas). En el inserto se muestra una magnificación del área recuadrada y se delimita el BOA derecho con línea punteada. V: ventrículo. A y C fueron modificados de Jungblut *et al.* (2012). Barras: 200µm.

OVN aparece en el estadio 37–38 de Nieuwkoop y Faber (N/F), previo a la diferenciación del opérculo (N/F 40) (Nieuwkoop y Faber, 1994). En *Lithobates pipiens*, *Rana japonica*, *Pelophylax nigromaculatus*, y *Rana chensinensis*, el OVN aparece en el estadio 21–23 de Gosner (1960) (G) (Cooper, 1943; Tsui, 1946; Taniguchi *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2008), mientras que en *Rhinella arenarum* e *Hypsiboas pulchellus* aparece en estadio G24–25 (Jungblut *et al.*, 2011; Jungblut *et al.*, 2012), en todos los casos cercano o previo al desarrollo del opérculo durante la etapa prelarval (G24–25). Incluso en la rana de desarrollo directo *Eleutherodactylus coqui*, que no presenta una etapa larval acuática y eclosiona como un juvenil terrestre, el OVN aparece tempranamente en el desarrollo, durante la etapa en que se forman los pliegues operculares, equivalente a un estadio aproximado de G23 en especies con desarrollo larval (Jermakowicz *et al.*, 2004).

Por supuesto que el hecho de que el OVN aparezca tempranamente durante la etapa embrionaria y esté presente durante toda la etapa larval no significa en absoluto que el SVN sea funcional en renacuajos. Ahora bien, suponiendo que efectivamente el SVN

no es funcional durante la etapa larval, entonces ¿Por qué aparecería tan tempranamente en el desarrollo de anuros? Varios estudios recientes han demostrado que los tejidos nerviosos, incluyendo el de los sistemas sensoriales, presentan un costo energético elevado tanto durante el procesamiento de información como durante el reposo (Attwell y Laughlin, 2001; Lennie, 2003; Niven *et al.*, 2003, 2007; Nawroth *et al.*, 2007). A raíz de esto, se ha propuesto que el sistema nervioso está sujeto a dos presiones selectivas en conflicto: por un lado la necesidad de minimizar el consumo energético y por otro ser capaz de generar comportamientos con valor adaptativo en condiciones ambientales fluctuantes (Niven y Laughlin, 2008). Más específicamente, existiría un compromiso en los sistemas sensoriales entre el costo energético de mantener una estructura sensorial que codifica para una modalidad sensorial particular y la cantidad de información útil y confiable que esta aporta (Niven y Laughlin, 2008). En este contexto, resulta curioso entonces que los renacuajos de todas las especies de anuros estudiadas afronten el costo energético de desarrollar un SVN tempranamente si éste sólo será funcional durante la vida adulta o

en etapas postmetamórficas. En este sentido, otras estructuras quimiosensoriales que participan en la detección de estímulos ambientales durante etapas postmetamórficas en anuros se desarrollan de novo en etapas cercanas o durante el clímax metamórfico (Jungblut *et al.*, 2011). Por ejemplo, los adultos de *X. laevis* y otros pípidos poseen un epitelio quimiosensorial revistiendo la cámara media olfatoria (Pater-son, 1951). Este epitelio sensorial no está presente durante la etapa larval temprana e intermedia de *X. laevis*, sino que comienza a desarrollarse hacia el final de la etapa larval en estadio N/F 53–54 comple-tando su desarrollo durante el clímax metamórfico (Nieuwkoop y Faber, 1994). Se ha demostrado que la presencia de este epitelio sensorial en la cámara media permite a los animales seguir detectando estí-mulos químicos en el agua luego de la metamorfosis (Iida y Kashiwayanagi, 1999; Nakamuta *et al.*, 2011). En *R. arenarum*, por otra parte, un epitelio sensorial se desarrolla de novo en el piso de la cavidad olfatoria principal durante el clímax metamórfico, aproxima-damente en G43 (Jungblut *et al.*, 2011). Este epitelio sensorial se corresponde con el *Recessus olfactorius* descrito en otros anuros (Helling, 1938), el cual se ha especulado que, al igual que el epitelio sensorial de la cámara media de los pípidos, permitiría a los animales seguir detectando estímulos en el agua durante etapas postmetamórficas (Helling, 1938; Jungblut *et al.*, 2011).

Como se mencionó previamente, una serie de parámetros histológicos y morfológicos indican que el SVN podría llegar a ser un sistema sensorial funcional en larvas de anuros. El OVN aparenta ser una estructura diferenciada en renacuajos, ya que desde los primeros estadios del desarrollo larval se evidencian NRV bipolares (Jungblut *et al.*, 2012), his-tológicamente muy similares a las descritas en otros grupos o en anfibios adultos (Wirsig-Wiechmann *et al.*, 2002). Más aún, utilizando técnicas de doble marcado de trazos neuronales e inmunodetección de proteínas sinápticas, se ha demostrado que las NRV proyectan sus axones hacia áreas específicas en el telencéfalo durante la etapa larval en donde establecen conexiones sinápticas con las neuronas del BOA (Nezlin *et al.*, 2003; Jungblut *et al.*, 2012). En un experimento interesante realizado en larvas de *X. laevis* se ha demostrado que las neuronas senso-riales de la cámara olfatoria principal son renovadas casi completamente durante el clímax metamórfico mientras que las neuronas del OVN no lo son (Higgs y Burd, 2001). Este recambio masivo de las neuronas

olfatorias durante la metamorfosis tiene que ver con cambios en la funcionalidad del epitelio sensorial de la cámara principal, el cual pasa de detectar estímu-los disueltos en el agua en las larvas (Vogler y Schild, 1999) a detectar estímulos en el aire durante la etapa postmetamórfica (Mezler *et al.*, 2001). La función larval de la cámara principal (detección de estímulos en el agua) es reemplazada en adultos por la cámara media que se forma durante la metamorfosis (Iida y Kashiwayanagi, 1999; Nakamuta *et al.*, 2011). El hecho de que la población de NRV sea mantenida durante la metamorfosis sugiere que, al menos en *X. laevis*, el OVN estaría detectando estímulos solubles en agua tanto durante etapas larvales como postme-tamórficas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los adultos de *X. laevis* son completamente acuáticos, por lo tanto es necesario corroborar si los resultados observados en esta especie representan o no lo que sucede en el OVN durante la metamorfosis de otros anuros.

Por su parte, los análisis de microscopía elec-trónica, aunque son escasos, muestran neuronas ya diferenciadas en el OVN durante etapas larvales tem-pranas en *X. laevis*, *R. arenarum* y *A. truei* (Hansen *et al.*, 1998; Jungblut *et al.*, 2009; Benzekri y Reiss, 2011), aunque en *Rana japonica* esta diferenciación neuronal a nivel ultraestructural se alcanza, aparen-temente, al final de la etapa larval (Taniguchi *et al.*, 1996). Las NRV de los renacuajos presentan mi-crovellosidades apicales como se ha descrito en el OVN de todos los grupos de vertebrados estudiados (Eisthen, 1992). Más aún, los trabajos realizados en *X. laevis* y *A. truei* en que se comparan los órganos quimiosensoriales entre larvas y adultos, muestran que las características ultraestructurales de las NRV son esencialmente las mismas en ambas etapas del ciclo de vida en estas especies (Hansen *et al.*, 1998; Benzekri y Reiss, 2011).

A nivel del telencéfalo anterior, el BOA tam-bién presenta características histológicas de una estructura anatómica con un grado importante de maduración. En los renacuajos de la mayoría de las especies se identifican estructuras glomerulares en el BOA (Nezlin y Schild, 2000; Jungblut *et al.*, 2012). Incluso, en algunos casos el número de glomérulos en el BOA es mayor que en el bulbo olfatorio princi-pal (Nezlin y Schild, 2000). A nivel ultraestructural, se ha demostrado que las conexiones sinápticas entre NRV y células mitrales del BOA en etapas larvales son casi idénticas a las observadas durante la vida adulta (Burton, 1990).

Finalmente, pero con el mismo nivel de relevancia, algunos datos provenientes de análisis bioquímicos y moleculares en renacuajos también sugieren que los componentes del SVN alcanzan una diferenciación considerable durante la etapa larval de anuros. En tetrápodos, las NRV expresan receptores de membrana característicos que difieren de los receptores expresados en neuronas olfatorias. Estos receptores son proteínas de siete pasos transmembrana que están acoplados a vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas. En mamíferos se han identificado dos familias de receptores llamadas V1R y V2R expresadas en diferentes poblaciones de NRV (Herrada y Dulac, 1997; Matsunami y Buck, 1997). En anfibios sólo se han identificado receptores de la familia V2R en el OVN, pero lo interesante es que estos receptores no sólo se expresan en adultos de *X. laevis* sino que están presentes en el OVN durante la etapa larval de esta especie (Hagino-Yamagishi *et al.*, 2004). Más aún, las NRV también poseen vías de señalización intracelular características, distintas de las utilizadas por las neuronas olfatorias. Las NRV que expresan receptores V1R utilizan la vía de señalización mediada por el segundo mensajero Gai2, mientras que las que expresan receptores V2R utilizan la vía mediada por Gao (Grus y Zhang, 2009). Esta última molécula (Gao) ha sido identificada en el OVN de *X. laevis* (Hagino-Yamagishi *et al.*, 2004) y de otros anfibios durante la etapa larval (Jungblut *et al.*, 2009; Jungblut *et al.*, 2012). Curiosamente, en adultos de *Bufo japonicus* se ha encontrado una subpoblación de NRV que expresan la proteína Gaolf (Hagino-Yamagishi y Nakazawa, 2011). Esta proteína está asociada a una familia diferente de receptores de membrana (receptores olfatorios) encontrados generalmente en neuronas del epitelio olfatorio, aunque no se ha analizado si esta subpoblación de NRV que expresan Gaolf se encuentra también en el OVN de las larvas de *B. japonicus*. Lo anteriormente expuesto demuestra que al menos una parte importante del sistema molecular involucrado en la quimiodetección en el OVN, como son los receptores de membrana que interactúan con los estímulos específicos y las proteínas G acopladas que desencadenan la señalización intracelular, se expresan en las NRV durante la etapa larval de anuros.

Conclusiones y Perspectivas

Una considerable cantidad de evidencia indica que

el SVN podría ser un sistema sensorial funcional en larvas de anuros. La gran mayoría de las especies de anuros analizadas hasta la actualidad presentan características histológicas, ultraestructurales y bioquímicas que indican la presencia de NRV con un importante grado de diferenciación durante la etapa larval. Sorprendentemente, no existe ningún trabajo, hasta donde nosotros conocemos, que evalúe la participación del SVN en la detección de estímulos específicos ya sea en etapas larvales o incluso durante la vida adulta en anuros. Es importante tener en cuenta que todos los datos recopilados en el presente artículo, y a partir de los cuales nosotros especulamos acerca de la posible funcionalidad del SVN en renacuajos, constituyen evidencias indirectas y es necesaria la realización de experimentos específicamente diseñados para su corroboración. En este sentido sería muy interesante, y relativamente sencillo, realizar experimentos de denervación o ablación del OVN en renacuajos para explorar si el SVN es funcional en etapas larvales. Este tipo de experimentos ha resultado muy útil para evaluar la participación del OVN en la detección de diferentes estímulos en reptiles y mamíferos (Halpern *et al.*, 1997; Fewell y Meredith, 2002). Si se comprueba que el SVN es funcional en renacuajos, esto plantea una serie de interrogantes: ¿Detecta el OVN de renacuajos estímulos diferentes a los detectados en el epitelio olfatorio? ¿Cuáles son las características de los estímulos detectados en el OVN? ¿En qué comportamientos está involucrada la detección de estos estímulos?

Las larvas de anuros presentan una serie de comportamientos mediados por detección de claves químicas y la mayoría de estas respuestas comportamentales resultan esenciales para la supervivencia de los individuos. Se ha demostrado que la quimiodetección es el principal modo sensorial involucrado en la localización de fuentes de alimento (Veeranagoudar *et al.*, 2004; Crossland y Shine, 2011; Crossland *et al.*, 2012), reconocimiento de predadores (Kiesecker *et al.*, 1996; Kiesecker y Blaustein, 1997; Scarabotti *et al.*, 2007; Fraker, 2008; Gonzalo *et al.*, 2009), detección de señales de alarma (Hews y Blaustein, 1985; Hews, 1988; Kiesecker *et al.*, 1999; Mirza *et al.*, 2006; Fraker *et al.*, 2009), interacciones entre la hembra y sus renacuajos (Kam y Yang, 2002), así como reconocimiento entre coespecíficos, heteroespecíficos y grado de parentesco entre individuos (Waldman, 1985; Blaustein y Waldman, 1992; Villinger y Waldman, 2008). Claramente, los

estímulos químicos detectados por los renacuajos son muy variados. Resultan particularmente interesante aquellos involucrados en la comunicación intraespecífica (feromonas), ya que éstos son posibles candidatos a ser detectados por el SVN. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el OVN no es un órgano sensorial especializado en la detección de feromonas (Baxi *et al.*, 2006), de tal forma que todos los estímulos deben ser considerados a la hora de evaluar la funcionalidad del SVN en renacuajos. En este sentido, una feromona de alarma que estimula comportamientos antipredatorios en renacuajos de *Lithobates clamitans* ha sido identificada y caracterizada. Esta señal, aparentemente está compuesta por dos pequeños péptidos que son producidos y liberados activamente en la epidermis (Fraker *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha estudiado que órgano sensorial participa en la detección de estos péptidos. Creemos entonces que la investigación en esta temática en larvas de anuros permitirá no sólo conocer aspectos relacionados con la comunicación química de los anfibios y sus interacciones sociales o con el ambiente, sino también dilucidar aspectos evolutivos de la quimiodetección en vertebrados, qué tipo de estímulos son detectados por el OVN, cómo interacciona este último con el sistema olfatorio principal, y qué consecuencias tiene la detección de tales estímulos sobre la fisiología y el comportamiento de los animales.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONICET por la Beca Doctoral otorgada a Lucas D. Jungblut, durante el transcurso de la cual se adquirieron los conocimientos necesarios para la realización de este artículo. Agradecemos también a los revisores anónimos que han contribuido enormemente a mejorar el manuscrito.

Literatura citada

- Alving, W.R. & Kardong, K.V. 1996. The role of the vomeronasal organ in rattlesnake (*Crotalus viridis oreganus*) predatory behavior. *Brain Behavior and Evolution* 48: 165-172.
- Attwell, D. & Laughlin, S.B. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 21: 1133-1145.
- Baxi, K.N.; Dorries, K.M. & Eisthen, H.L. 2006. Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones? *Trends in Neurosciences* 29: 1-7.
- Belluscio, L.; Koentges, G.; Axel, R. & Dulac, C. 1999. A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 97: 209-20.
- Benzekri, N.A. & Reiss, J.O. 2011. Olfactory metamorphosis in the coastal tailed frog *Ascaphus truei* (Amphibia, Anura, Leiopelmatidae). *Journal of Morphology* 273: 68-87.
- Bertmar, G. 1981. Evolution of vomeronasal organs in vertebrates. *Evolution* 35: 359-366.
- Bhatnagar, K.P. & Meisami, E. 1998. Vomeronasal organ in bats and primates: Extremes of structural variability and its phylogenetic implications. *Microscopy Research and Technique* 43: 465-475.
- Blaustein, A.R. & Waldman, B. 1992. Kin recognition in anuran amphibians. *Animal Behaviour* 44: 207-221.
- Buck, L.B. 2000. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100: 611-618.
- Burton, P.R. 1990. Vomeronasal and olfactory nerves of adult and larval bullfrogs: II. Axon terminations and synaptic contacts in the accessory olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 292: 624-637.
- Cooper, R.S. 1943. An experimental study of the development of the larval olfactory organ of *Rana pipiens* Schreber. *Journal of Experimental Zoology* 93: 415-451.
- Crossland, M.R. & Shine, R. 2011. Cues for cannibalism: cane toad tadpoles use chemical signals to locate and consume conspecific eggs. *Oikos* 120: 327-332.
- Crossland, M.R.; Haramura, T.; Salim, A.A.; Capon, R.J. & Shine, R. 2012. Exploiting intraspecific competitive mechanisms to control invasive cane toads (*Rhinella marina*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 279: 3436-3442.
- Døving, K.B.; Trotier, D.; Rosin, J-F. & Holley, A. 1993. Functional architecture of the vomeronasal organ of the frog (genus *Rana*). *Acta Zoologica (Stockholm)* 74: 173-180.
- Dulac, C. 2000. Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 511-518.
- Eisthen, H.L. 1992. Phylogeny of the vomeronasal system and of receptor cell types in the olfactory and vomeronasal epithelia of vertebrates. *Microscopy Research and Technique* 23: 1-21.
- Eisthen, H.L. 1997. Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain Behavior and Evolution* 50: 222-233.
- Eisthen, H.L. 2000. Presence of the vomeronasal system in aquatic salamanders. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Science* 355: 1209-1213.
- Eisthen, H.L. & Polese, G. 2007. Evolution of Vertebrate Olfactory Subsystems: 355-406. *En: Kaas, J.H. & Bullock, T.H. (eds.), Evolution of nervous systems, Vol. 2: Non-mammalian vertebrates*, Oxford: Academic Press, New York.
- Farbman, A.I. 1992. *Cell Biology of Olfaction*. Cambridge University Press, New York.
- Farbman, A.I. & Gesteland, R.C. 1974. Fine structure of olfactory epithelium in the mud puppy, *Necturus maculosus*. *American Journal of Anatomy* 139: 227-243.
- Fewell, G.D. & Meredith, M. 2002. Experience facilitates vomeronasal and olfactory influence on Fos expression in medial preoptic area during pheromone exposure or mating in male hamsters. *Brain Research* 941: 91-106.
- Fraker, M.E. 2008. The dynamics of predation risk assessment: responses of anuran larvae to chemical cues of predators. *Journal of Animal Ecology* 77: 638-645.
- Fraker, M.E.; Hu, F.; Cuddapah, V.; McCollum, S.A.; Relyea, R.A.; Hempel, J. & Denver, R.J. 2009. Characterization of an alarm pheromone secreted by amphibian tadpoles that induces behavioral inhibition and suppression of the neuroendocrine stress axis. *Hormones and Behavior* 55: 520-529.

- Frost, Darrel R. 2011. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31 January, 2011). Disponible en: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>. Último acceso: 25 noviembre 2012.
- Gonzalez, A.; Morona, R.; Lopez, J.M.; Moreno, N. & Northcutt, R.G. 2011. Lungfishes, like tetrapods, possess a vomeronasal system. *Frontiers in Neuroanatomy* 4: 130.
- Gonzalo, A.; Lopez, P. & Martin, J. 2009. Learning, memorizing and apparent forgetting of chemical cues from new predators by Iberian green frog tadpoles. *Animal Cognition* 12: 745-750.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anurans embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- Graves, B.M. & Halpern, M. 1990. Roles of vomeronasal organ chemoreception in tongue flicking, exploratory and feeding behaviour of the lizard, *Chalcides ocellatus*. *Animal Behaviour* 39: 692-698.
- Grus, W.E. & Zhang, J. 2006. Origin and evolution of the vertebrate vomeronasal system viewed through system-specific genes. *Bioessays* 28: 709-718.
- Grus, W.E. & Zhang, J. 2009. Origin of the genetic components of the vomeronasal system in the common ancestor of all extant vertebrates. *Molecular Biology and Evolution* 26: 407-419.
- Hagino-Yamagishi, K.; Moriya, K.; Kubo, H.; Wakabayashi, Y.; Isobe, N.; Saito, S.; Ichikawa, M. & Yazaki, K. 2004. Expression of vomeronasal receptor genes in *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Neurology* 472: 246-256.
- Hagino-Yamagishi, K. & Nakazawa, H. 2011. Involvement of Galpha(olf) -expressing neurons in the vomeronasal system of *Bufo japonicus*. *Journal of Comparative Neurology* 519: 3189-3201.
- Halpern, M. & Martinez-Marcos, A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology* 70: 245-318.
- Halpern, M.; Daniels, Y. & Zuri, I. 2005. The role of the vomeronasal system in food preferences of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Nutrition & Metabolism (Lond)* 2: 6.
- Halpern, M.; Halpern, J.; Erichsen, E. & Borghjid, S. 1997. The role of nasal chemical senses in garter snake response to airborne odor cues from prey. *Journal of Comparative Psychology* 111: 251-260.
- Hansen, A.; Reiss, J.O.; Gentry, C.L. & Burd, G.D. 1998. Ultrastructure of the olfactory organ in the clawed frog, *Xenopus laevis*, during larval development and metamorphosis. *Journal of Comparative Neurology* 398: 273-288.
- Helling, H. 1938. Das Geruchsorgan der Anuren, vergleichend-morphologisch betrachtet. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 108: 587-643.
- Herrada, G. & Dulac, C. 1997. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90: 763-773.
- Hews, D.K. 1988. Alarm response in larval western toads, *Bufo boreas*: release of larval chemicals by a natural predator and its effect on predator capture efficiency. *Animal Behaviour* 36: 125-133.
- Hews, D.K. & Blaustein, A.R. 1985. An investigation of the alarm response in *Bufo boreas* and *Rana cascadae* tadpoles. *Behavioral and Neural Biology* 43: 47-57.
- Higgs, D.M. & Burd, G.D. 2001. Neuronal turnover in the *Xenopus laevis* olfactory epithelium during metamorphosis. *Journal of Comparative Neurology* 433: 124-130.
- Hinsberg, V. 1901. Die Entwicklung der Nasenhöhle bei Amphibien. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 58: 411-482.
- Iida, A. & Kashiwayanagi, M. 1999. Responses of *Xenopus laevis* water nose to water-soluble and volatile odorants. *Journal of General Physiology* 114: 85-92.
- Jermakowicz III, W.J.; Dorsey, D.A.; Brown, A.L.; Wojciechowski, K.; Giscombe, C.L.; Graves, B.M.; Summers, C.H. & Ten Eyck, G.R. 2004. Development of the nasal chemosensory organs in two terrestrial anurans: the directly developing frog, *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae), and the metamorphosing toad, *Bufo americanus* (Anura: Bufonidae). *Journal of Morphology* 261: 225-248.
- Jungblut, L.D.; Paz, D.A.; Lopez-Costa, J.J. & Pozzi, A.G. 2009. Heterogeneous distribution of G protein alpha subunits in the main olfactory and vomeronasal systems of *Rhinella (Bufo) arenarum* tadpoles. *Zoological Science* 26: 722-728.
- Jungblut, L.D.; Pozzi, A.G. & Paz, D.A. 2011. Larval development and metamorphosis of the olfactory and vomeronasal organs in the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* (Hensel, 1867). *Acta Zoologica (Stockholm)* 92: 305-315.
- Jungblut, L.D.; Pozzi, A.G. & Paz, D.A. 2012. A putative functional vomeronasal system in anuran tadpoles. *Journal of Anatomy* 221: 364-372.
- Kam, Y.-C. & Yang, H.-W. 2002. Female-offspring communication in a Taiwanese tree frog, *Chirixalus eiffingeri* (Anura: Rhacophoridae). *Animal Behaviour* 64: 881-886.
- Keverne, E.B. 2004. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiology & Behavior* 83: 177-187.
- Khalil, S.H. 1978. Development of the olfactory organ of the Egyptian toad, *Bufo regularis* Reuss. I. Larval period. *Folia Morphologica (Prague)* 26: 69-74.
- Kiesecker, J.M. & Blaustein, A.R. 1997. Population differences in responses of red-legged frogs (*Rana aurora*) to introduced bullfrogs. *Ecology* 78: 1752-1760.
- Kiesecker, J.M.; Chivers, D.P. & Blaustein, A.R. 1996. The use of chemical cues in predator recognition by western toad tadpoles. *Animal Behaviour* 52: 1237-1245.
- Kiesecker, J.M.; Chivers, D.P.; Marco, A.; Quilchano, C.; Anderson, M.T. & Blaustein, A.R. 1999. Identification of a disturbance signal in larval red-legged frogs, *Rana aurora*. *Animal Behaviour* 57: 1295-1300.
- Královec, K.; Zakova, P. & Muzakova, V. 2012. Development of the olfactory and vomeronasal organs in *Discoglossus pictus* (Discoglossidae, Anura). *Journal of Morphology*. doi: 10.1002/jmor.20073.
- Lennie, P. 2003. The cost of cortical computation. *Current Biology* 13: 493-497.
- Matsunami, H. & Buck, L.B. 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90: 775-784.
- Meredith, M. 1986. Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiology and Behavior* 36: 737-743.
- Mezler, M.; Fleischer, J.; Conzelmann, S.; Korchi, A.; Widmayer, P.; Breer, H. & Boekhoff, I. 2001. Identification of a

- nonmammalian Golf subtype: functional role in olfactory signaling of airborne odorants in *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Neurology* 439: 400-410.
- Mirza, R.S.; Ferrari, M.C.O.; Kiesecker, J.M. & Chivers, D.P. 2006. Responses of American toad tadpoles to predation cues: behavioural response thresholds, threat-sensitivity and acquired predation recognition. *Behaviour* 143: 877-889.
- Moreno, N. & Gonzalez, A. 2007. Evolution of the amygdaloid complex in vertebrates, with special reference to the anamnio-amniotic transition. *Journal of Anatomy* 211: 151-163.
- Nakamuta, S.; Nakamuta, N. & Taniguchi, K. 2011. Distinct axonal projections from two types of olfactory receptor neurons in the middle chamber epithelium of *Xenopus laevis*. *Cell and Tissue Research* 346: 27-33.
- Nawroth, J.C., Greer, C.A., Chen, W.R., Laughlin, S.B. & Shepherd, G.M. 2007. An energy budget for the olfactory glomerulus. *Journal of Neuroscience* 27: 9790-9800.
- Nezlin, L.P. & Schild, D. 2000. Structure of the olfactory bulb in tadpoles of *Xenopus laevis*. *Cell and Tissue Research* 302: 21-29.
- Nezlin, L.P.; Heermann, S.; Schild, D. & Rossler, W. 2003. Organization of glomeruli in the main olfactory bulb of *Xenopus laevis* tadpoles. *Journal of Comparative Neurology* 464: 257-268.
- Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. 1994. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland, Amsterdam.
- Niven, J.E. & Laughlin, S.B. 2008. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *The Journal of Experimental Biology* 211: 1792-1804.
- Niven, J.E., Anderson, J.C. & Laughlin, S.B. 2007. Fly photoreceptors demonstrate energy-information trade-offs in neural coding. *PLOS Biology* 5: 828-840.
- Niven, J.E., Vähäsöyrinki, M. & Juusola, M. 2003. Shaker K⁺-channels are predicted to reduce the metabolic cost of neural information in *Drosophila* photoreceptors. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270: 58-61.
- Papes, F.; Logan, D.W. & Stowers, L. 2010. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* 141: 692-703.
- Paterson, N.F. 1951. The nasal cavities of the toad *Hemiphaedusa carvalhoi* Mir.-Rib. and other Pipidae. *Proceedings of the Zoological Society of London* 121: 381-415.
- Placyk, J.S., Jr. & Graves, B.M. 2002. Prey detection by vomeronasal chemoreception in a plethodontid salamander. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1017-1036.
- Reiss, J.O. & Eisthen, H.L. 2008. Comparative Anatomy and Physiology of Chemical Senses in Amphibians: 43-63. *En: Thewissen, J.G.M. & Nummela, S. (eds.), Sensory Evolution on the Threshold: Adaptations in Secondarily Aquatic Vertebrates*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.
- Rowedder, W. 1937. Die Entwicklung des Geruchsorgans bei *Alytes obstetricans* und *Bufo vulgaris*. *Zeitschrift fuer Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 107: 91-123.
- Scarabotti, P.A.; López, J.A. & Ghirardi, R. 2007. Behavioural responses of *Odontophrynus americanus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae) to fish chemical cues. *Cuadernos de Herpetología* 21: 45-52.
- Schaal, B.; Coureaud, G.; Langlois, D.; Ginies, C.; Semon, E. & Perrier, G. 2003. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 424: 68-72.
- Schmidt, A. & Wake, M.H. 1990. Olfactory and vomeronasal systems of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Journal of Morphology* 205: 255-268.
- Seydel, O. 1895. Über die Nasenhöhle und das Jacobson'sche Organ der Amphibien: Eine vergleichend-anatomische Untersuchung. *Morphologisches Jahrbuch* 23: 453-543.
- Shepherd, G.M. 2006. Behaviour: smells, brains and hormones. *Nature* 439: 149-151.
- Shine, R. 2003. Reproductive strategies in snakes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270: 995-1004.
- Stuelpnagel, J.T. & Reiss, J.O. 2005. Olfactory metamorphosis in the Coastal giant salamander (*Dicamptodon tenebrosus*). *Journal of Morphology* 266: 22-45.
- Taniguchi, K.; Toshima, Y. & Saito, T.R. 1996. Development of the olfactory epithelium and vomeronasal organ in the Japanese reddish frog, *Rana japonica*. *Journal of Veterinary Medical Science* 58: 7-15.
- Toyoda, F. & Kikuyama, S. 2000. Hormonal influence on the olfactory response to a female-attracting pheromone, sodefrin, in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 126: 239-245.
- Tsui, C.L. 1946. Development of olfactory organ in *Rana nigromaculata*. *The Quarterly Journal of Microscopical Science* 87: 61-90.
- Tsui, C.L. & Pan, T.H. 1946. The development of the olfactory organ of *Kaloula borealis* (Barbour) as compared with that of *Rana nigromaculata* Hallowell. *The Quarterly Journal of Microscopical Science* 87: 299-316.
- Veeranagoudar, D.K.; Shanbhag, B.A. & Saidapur, S.K. 2004. Mechanism of food detection in the tadpoles of the bronze frog *Rana temporalis*. *Acta Ethologica* 7: 37-41.
- Villinger, J. & Waldman, B. 2008. Self-referent MHC type matching in frog tadpoles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science* 275: 1225-1230.
- Vogler, C. & Schild, D. 1999. Inhibitory and excitatory responses of olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles to stimulation with amino acids. *Journal of Experimental Biology* 202: 997-1003.
- Waldman, B. 1985. Olfactory basis of kin recognition in toad tadpoles. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 156: 565-577.
- Wang, H.; Zhao, H.; Tai, F. & Zhang, Y. 2008. Postembryonic development of the olfactory and vomeronasal organs in the frog *Rana chensinensis*. *Zoological Science* 25: 503-508.
- Wirsig-Wiechmann, C.R.; Houck, L.D.; Feldhoff, P.W. & Feldhoff, R.C. 2002. Pheromonal activation of vomeronasal neurons in plethodontid salamanders. *Brain Research* 952: 335-344.
- Yvroud, M. 1966. Développement de l'organe olfactif et des glandes annexes chez *Alytes obstetricans* Laurenti au cours de la vie larvaire et de la métamorphose. *Archives d'Anatomie microscopique* 55: 387-410.